

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication : **2 722 208**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **94 08300**

(51) Int Cl<sup>e</sup> : C 12 N 15/11, 15/85, 15/86, 7/01, 5/10, A 61 K 48/00

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

(22) Date de dépôt : 05.07.94.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 12.01.98 Bulletin 98/02.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés : DIVISION DEMANDÉE LE 09/08/95  
BÉNÉFICIAIRE DE LA DATE DE DÉPÔT DU  
09/12/94 DE LA DEMANDE INITIALE N° 94 14830  
(ARTICLE L.612-4) DU CODE DE LA PROPRIÉTÉ  
INTELLECTUELLE

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ  
ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE INSERM  
ÉTABLISS PUBLIC À CARACT SCIENT ET TECH —  
FR.

(72) Inventeur(s) : BERLIOZ CLARISSE, JACQUEMOUD  
SANDRINE, TORRENT CHRISTOPHE et DARLIX  
JEAN LUC.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : REGIMBEAU.

(54) **NOUVEAU SITE INTERNE D'ENTRÉE DES RIBOSOMES, VECTEUR LE CONTENANT ET UTILISATION  
THÉRAPEUTIQUE.**

(57) La présente invention a pour objet un nouveau site in-  
terne d'entrée des ribosomes et une nouvelle région d'en-  
capsidation d'un rétrotransposon et notamment des VL30  
murins. Elle concerne également un vecteur et une cellule  
eucaryote les contenant ainsi que leur usage thérapeutique  
ou prophylactique.

FR 2 722 208 - A1



5

10

Nouveau site interne d'entrée des ribosomes, vecteur le contenant et utilisation thérapeutique

15

La présente invention concerne un fragment d'ADN isolé d'un rétrotransposon et comprenant un site interne d'entrée des ribosomes (IRES). Plus particulièrement, elle concerne des vecteurs d'expression comportant ce fragment d'ADN et notamment des vecteurs polycistroniques permettant l'expression efficace et stable de plusieurs gènes d'intérêt sous la dépendance d'un même promoteur. La présente invention

20

trouve une application intéressante dans le domaine des vecteurs de thérapie génique.

La faisabilité de la thérapie génique appliquée à l'homme n'est plus à démontrer et ceci concerne de nombreuses applications thérapeutiques comme les maladies génétiques, les maladies infectieuses et les cancers. De nombreux documents de l'art

antérieur décrivent les moyens de mettre en oeuvre une thérapie génique, notamment par l'intermédiaire de vecteurs viraux. D'une manière générale, les vecteurs sont obtenus par délétion d'au moins une partie des gènes viraux qui sont remplacés par les gènes d'intérêt thérapeutique. De tels vecteurs peuvent être propagés dans une lignée de complémentation qui fournit *en trans* les fonctions virales délétées pour

générer une particule de vecteur viral défective pour la réplication mais capable d'infecter une cellule hôte. A ce jour, les vecteurs rétroviraux sont parmi les plus utilisés mais on peut citer également des vecteurs issus des adénovirus, virus associés aux adénovirus, poxvirus et virus de l'herpès. Ce type de vecteur, leur organisation et leur mode d'infection sont largement décrits dans la littérature

accessible à l'homme de l'art.

25

30

35

Il peut être avantageux de disposer de vecteurs de thérapie génique plus performants

et capables notamment de produire efficacement plusieurs protéines d'intérêt. Cependant, la présence de plusieurs promoteurs au sein du même vecteur se traduit très souvent par une réduction voire même une perte de l'expression au cours du temps. Ceci est dû à un phénomène bien connu d'interférence entre les séquences promotrices. Dans ce contexte, la publication de la demande internationale WO93/03143 propose une solution à ce problème qui consiste à mettre en oeuvre un site interne d'entrée des ribosomes (IRES). Elle décrit un vecteur rétroviral dicistronique pour l'expression de deux gènes d'intérêt placés sous le contrôle du même promoteur. La présence d'un site IRES de picornavirus entre ceux-ci permet la production du produit d'expression issu du second gène d'intérêt par initiation interne de la traduction de l'ARNm dicistronique.

Normalement, l'entrée des ribosomes au niveau de l'ARN messager se fait par la coiffe située à l'extrémité 5' de l'ensemble des ARNm eucaryotes. Cependant cette règle universelle connaît des exceptions. L'absence de coiffe chez certains ARNm viraux laissait supposer l'existence de structures alternatives permettant l'entrée des ribosomes à un site interne de ces ARN. A ce jour, un certain nombre de ces structures, nommées IRES du fait de leur fonction, ont été identifiées dans la région 5' non codante des ARNm viraux non coiffés comme celle notamment des picornavirus tel que le virus de la poliomyélite (Pelletier et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 1103-1112) et l'EMCV (Encephalomyocarditis virus (Jang et al., J. Virol., 1988, 62, 2636-2643).

On a maintenant trouvé un nouveau site interne d'entrée des ribosomes dans les rétrotransposons murins de type VL30 et montré que ce site améliore la traduction des séquences codantes placées à sa suite.

Le génome des cellules eucaryotes comprend un certain nombre d'éléments génétiques cellulaires mobiles, appelés transposons, qui ont la capacité de se déplacer d'un site du génome à un autre choisi au hasard. A l'heure actuelle, on ignore leurs fonction et signification biologique. Certains d'entre eux, les rétrotransposons, apparaissent apparentés aux provirus rétroviraux par leur organisation et leur mode de transposition (par un intermédiaire ARN, transcription inverse et intégration dans le génome cellulaire). Parmi les différents rétrotransposons murins identifiés à ce jour, figurent les éléments VL30. Le génome murin en comprend de 150 à 200 copies. Ils ont une longueur d'environ 6 kb et possèdent à leurs extrémités des répétitions directes qui rappellent les LTRs

5 rétroviraux. Ils sont défectifs pour la réplication et ne contiennent pas de séquences codantes (codons d'arrêt de la traduction dans les différentes phases de lecture). Ces éléments en tant que tels sont décrits dans la littérature et leur séquence nucléotidique connue (Adams et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 2989-2998 ; Van Beveren, Coffin et Hughes 1984. Restriction analysis of two genomes and restriction maps of representative retroviral proviruses and cellular oncogenes p.559-1209, ed : Weiss, Teich, Varmus et Coffin ; RNA tumor viruses, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory). Par ailleurs, ils peuvent être transmis d'une cellule à l'autre par encapsidation en présence d'un virus auxiliaire (helper).

10 Il n'était pas évident d'identifier une séquence IRES dans les éléments VL30 murins puisque ceux-ci sont dépourvus de séquences codant pour des protéines et ne présentent pas d'homologie frappante de séquence avec les sites déjà décrits dans la littérature. De plus, par rapport à ces derniers, le site IRES d'un VL30 murin est  
15 particulièrement avantageux. En premier lieu, il permet un taux de réinitiation de la traduction efficace et stable à long terme et, d'autre part et de manière inattendue, il peut également, dans le cadre d'un vecteur rétroviral, remplir les fonctions de dimérisation et d'encapsidation et ceci indépendamment de sa position dans le vecteur. Et enfin, du fait de sa faible homologie avec les séquences rétrovirales, son  
20 emploi réduit considérablement le risque de production de virus compétents pour la réplication, propriété avantageuse dans le cadre des vecteurs de thérapie génique destinés à un usage humain.

25 C'est pourquoi la présente invention a pour objet un fragment d'ADN isolé comprenant un site interne d'entrée des ribosomes (IRES) et/ou une séquence d'encapsidation, caractérisé en ce qu'il est dérivé d'un rétrotransposon.

30 Par fragment d'ADN isolé, on entend un fragment d'ADN isolé de son contexte c'est à dire non associé à une autre séquence de rétrotransposon autre que celle définie ci-dessous. Le terme "rétrotransposon" se rapporte à un élément génétique cellulaire mobile qui présente des caractéristiques de type rétroviral, notamment par l'existence de répétitions directes à ses deux extrémités. Par IRES, on désigne une séquence capable de promouvoir l'entrée des ribosomes dans une molécule d'ARN d'une manière indépendante de la coiffe, au niveau d'un site interne de cet ARN.  
35 Une séquence d'encapsidation, est une séquence impliquée dans le processus d'encapsidation des rétrovirus ou vecteurs rétroviraux en favorisant la dimérisation de deux copies du génome rétroviral et en permettant l'encapsidation du dimère dans

les particules virales. Le terme "dérivé" fait référence à une structure ayant une origine rétrotransposon mais qui peut avoir subi quelques modifications, avoir été obtenue par synthèse chimique ou encore d'éléments divers comprenant des parties de retrotransposon, comme le virus HaMSV.

5

Selon un mode de réalisation préféré, un fragment d'ADN selon l'invention est capable d'exercer une fonction IRES et une fonction d'encapsidation lorsqu'il est introduit dans un vecteur rétroviral approprié.

10

Dans le cadre de la présente invention, un fragment d'ADN selon l'invention est isolé de l'extrémité 5' d'un rétrotransposon et notamment de la région qui suit directement la répétition directe située à son extrémité 5' (LTR-like 5') et, en particulier, le site de liaison à l'ARN transfert (PBS). Il va sans dire qu'il peut être isolé par toute technique en usage dans le domaine de l'art, par exemple par clonage à l'aide de sondes appropriées, par PCR (Polymerase Chain reaction) ou encore synthèse chimique. Aux fins de la présente invention, il comprend au moins 100 nucléotides de ladite région, avantageusement au moins 200 nucléotides, de préférence au moins 300 nucléotides, de manière préférée au moins 400 nucléotides et, de manière tout à fait préférée, au moins 550 nucléotides, ceci en comptant les nucléotides hors la répétition directe en 5'. Mais, bien entendu, il peut s'étendre au delà dans la direction 3' jusqu'à au plus 1,5 kb.

15

20

25

Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, un fragment d'ADN selon l'invention, est dérivé d'un élément VL30 d'origine murine et tout particulièrement de rat ou de souris. S'agissant de la première variante selon laquelle un fragment d'ADN est isolé d'un VL30 de rat, on préfère tout particulièrement mettre en oeuvre un fragment d'ADN ayant une séquence substantiellement homologue à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 1, commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 590.

30

35

Selon la deuxième variante (fragment d'ADN isolé d'un VL30 de souris), on aura de préférence recours à un fragment d'ADN présentant une séquence substantiellement homologue à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2, commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 788.

Le terme substantiellement homologue fait référence à un degré d'homologie

supérieur à 70%, avantageusement supérieur à 80%, de préférence supérieur à 90% et, de manière tout à fait préférée, supérieur à 95%. Ainsi, un fragment d'ADN selon l'invention peut avoir une séquence légèrement différente d'une des séquences décrites dans les identificateurs de séquence 1 et 2, à la condition toutefois que la substitution, la délétion ou l'addition d'un ou plusieurs nucléotides n'affecte pas sa fonction IRES et/ou la fonction d'encapsidation.

D'une manière générale, un fragment d'ADN selon l'invention est destiné à être intégré (dans une orientation quelconque) dans un vecteur de transfert et d'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt. Le choix d'un tel vecteur est large et les techniques de clonage dans le vecteur retenu sont à la portée de l'homme de l'art. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, on peut envisager un vecteur plasmidique ou un vecteur dérivé d'un virus animal et, en particulier, d'un poxvirus (canari pox ou virus de la vaccine), adénovirus, baculovirus, virus de l'herpès, virus associé à un adénovirus ou rétrovirus. De tels vecteurs sont largement décrits dans la littérature. En particulier, lorsqu'il s'agit d'un vecteur adénoviral, celui-ci peut être issu d'un adénovirus humain, de préférence de type 2 ou 5, animal, de préférence canin ou aviaire, ou encore d'un hybride entre des espèces variées. La technologie générale concernant les adénovirus est divulguée dans Graham et Prevec (1991, *Methods in Molecular Biology*, Vol 7, *Gene transfer and Expression Protocols* ; Ed E.J. Murray, the human Press Inc, 109-118).

Dans le cadre de la présente invention, un fragment d'ADN selon l'invention est de préférence positionné en amont d'un gène d'intérêt pour améliorer la traduction du produit d'expression pour lequel celui-ci code. Il peut être inclus dans une cassette d'expression de type monocistronique (pour l'expression d'un gène d'intérêt placé sous le contrôle d'un promoteur) ou polycistronique (pour l'expression d'au moins deux gènes d'intérêt placés sous le contrôle d'un même promoteur). Cette dernière peut contenir plusieurs éléments en tandem "site IRES-gène d'intérêt" dont au moins un des sites IRES est constitué par un fragment d'ADN selon l'invention. On préfère tout particulièrement le mettre en oeuvre dans une cassette dicistronique dans laquelle il peut être inséré soit en amont du premier gène d'intérêt soit en amont du second, cette dernière variante étant la préférée.

Lorsqu'un vecteur selon l'invention comprend plusieurs cassettes d'expression, celles-ci peuvent être insérées dans une orientation quelconque les unes par rapport aux autres ; dans une même orientation (promoteur agissant dans une même

direction) ou en orientation réverse (promoteur agissant dans une orientation opposée).

5 Dans le cas où un vecteur selon l'invention comprend plusieurs fragments d'ADN selon l'invention, il est préférable qu'ils soient issus de rétrotransposons d'origines différentes. Selon ce mode de réalisation particulier, on préfère qu'un des fragments soit dérivé d'un VL30 de rat et présente notamment une séquence substantiellement homologue à la SEQ ID NO: 1 et que l'autre soit dérivé d'un VL30 de souris et présente notamment une séquence substantiellement homologue à la SEQ ID NO: 2.

10 Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, un vecteur selon l'invention dérive d'un rétrovirus. On peut citer à titre d'exemples, les rétrovirus aviaires tels que le virus de l'érythroblastose aviaire (AEV), le virus de la leucémie aviaire (AVL), le virus du sarcome aviaire (ASV), le virus de la nécrose de la rate (SNV) et le virus du sarcome de Rous (RSV), les rétrovirus bovins, les rétrovirus félins, les rétrovirus murins tels que le virus de la leucémie murine (MuLV), le virus de Friend (F-MLV) et le virus du sarcome murin (MSV) et les rétrovirus de primate. Bien entendu, d'autres rétrovirus peuvent être mis en oeuvre. Cependant, on préfère tout particulièrement avoir recours au virus de la leucémie murine de Moloney (MoMuLV). Les nombreux vecteurs rétroviraux dérivés de ce dernier qui sont décrits dans la littérature, notamment le vecteur N2 ou un de ses dérivés peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention.

25 Les vecteurs rétroviraux envisageables aux fins de la présente invention sont schématisés dans la Figure 1 (a, b et c). Bien entendu, ces exemples ne sont pas limitatifs. Pour plus de clarté, les LTRs 5' et 3' rétroviraux sont représentés par une boîte hachurée, les séquences de VL30 murin (indifféremment souris et/ou rat) par un trait gras, le promoteur interne par une boîte pointillée, les gènes d'intérêt par une boîte blanche et enfin la région d'encapsidation (Psi) rétrovirale par un trait fin.

30 Comme cela est illustré, le LTR 5' rétroviral peut être utilisé comme promoteur pour l'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt mais on peut également avoir recours à un promoteur interne. D'autre part, un vecteur rétroviral selon l'invention peut, de façon optionnelle, comporter une région d'encapsidation rétrovirale comme la séquence Psi du MoMuLV. Cependant, la présence de cette dernière n'est pas

35 exigée dans la mesure où un fragment d'ADN selon l'invention peut également remplir cette fonction et ceci quelle que soit sa position dans le vecteur rétroviral de l'invention (en amont d'un gène d'intérêt et/ou en aval du LTR 5').

Aux fins de la présente invention, un gène d'intérêt en usage dans l'invention peut être obtenu d'un organisme eucaryote, procaryote ou d'un virus par toute technique conventionnelle. Il est, de préférence, capable de produire un produit d'expression ayant un effet thérapeutique et il peut s'agir d'un produit homologue à la cellule hôte ou, de manière alternative, hétérologue. Le terme produit d'expression désigne une protéine ou un fragment de celle-ci. Dans le cadre de la présente invention, un gène d'intérêt peut coder pour un produit (i) intracellulaire (ii) membranaire présent à la surface de la cellule hôte ou (iii) sécrété hors de la cellule hôte. Il peut donc comprendre des éléments additionnels appropriés comme, par exemple, une séquence codant pour un signal de sécrétion. Ces signaux sont connus de l'homme de l'art.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un gène d'intérêt peut coder pour une protéine correspondant à tout ou partie d'une protéine native telle que trouvée dans la nature. Il peut également s'agir d'une protéine chimérique, par exemple provenant de la fusion de polypeptide d'origines diverses ou d'un mutant présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées. Un tel mutant peut être obtenu par des techniques de biologie classiques par substitution, délétion et/ou addition d'un ou plusieurs résidus acides aminés.

On préfère tout particulièrement mettre en oeuvre un gène d'intérêt thérapeutique codant pour un produit d'expression capable d'inhiber ou retarder l'établissement et/ou le développement d'une maladie génétique ou acquise. Un vecteur selon l'invention est particulièrement destiné à la prévention ou au traitement de la mucoviscidose, de l'hémophilie A ou B, de la myopathie de Duchenne ou de Becker, du cancer, du SIDA et d'autres bactéries ou maladies infectieuses dues à un organisme pathogène : virus, bactérie, parasite ou prion. Les gènes d'intérêt utilisables dans la présente invention, sont ceux qui codent pour les protéines suivantes :

- une cytokine et notamment une interleukine, un interféron, un facteur de nécrose tissulaire et un facteur de croissance et notamment hématopoïétique (G-CSF, GM-CSF),
- un facteur ou cofacteur impliqué dans la coagulation et notamment le facteur VIII, le facteur IX, le facteur von Willebrand, l'antithrombine III, la protéine C, la thrombine et l'hirudine,



- une enzyme et notamment la trypsine, une ribonucléase et la  $\beta$ -galactosidase,
- un inhibiteur d'enzyme tel que l' $\alpha$ 1-antitrypsine et les inhibiteurs de protéases virales
- 5 - un produit d'expression d'un gène suicide comme la thymidine kinase du virus HSV (virus de l'herpès) de type 1,
- un activateur ou un inhibiteur de canaux ioniques,
- 10 - une protéine dont l'absence, la modification ou la dérégulation de l'expression est responsable d'une maladie génétique, telle que la protéine CFTR, la dystrophine ou minidystrophine, l'insuline, l'ADA (adénosine diaminase), la glucocérébrosidase et la phénylhydroxylase,
- 15 - une protéine capable d'inhiber l'initiation ou la progression de cancers, telles que les produits d'expression des gènes supresseurs de tumeurs, par exemple les gènes p53 et Rb, et
- 20 - une protéine capable de stimuler une réponse immunitaire ou un anticorps,
- une protéine capable d'inhiber une infection virale ou son développement, par exemple les épitopes antigéniques du virus en cause ou des variants altérés de protéines virales susceptibles d'entrer en compétition avec les
- 25 protéines virales natives.

Par ailleurs, un gène d'intérêt en usage dans la présente invention, peut également coder pour un marqueur de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules hôtes transfectées par un vecteur selon l'invention. On peut citer le gène *néo* (néomycine) conférant une résistance à l'antibiotique G418, le gène *dhfr* (dihydrofolate réductase), le gène CAT (Chloramphenicol Acetyl Transférase) ou encore le gène *gpt* (xanthine phosphoribosyl).

D'une manière générale, on aura recours pour l'expression d'un ou des gène(s) d'intérêt à un promoteur fonctionnel dans la cellule hôte considérée et, de préférence, une cellule humaine. Le choix du promoteur est très large et à la portée de l'homme du métier. Il peut s'agir d'un promoteur gouvernant naturellement

l'expression d'un gène d'intérêt en usage dans la présente invention ou de tout autre promoteur (d'origine eucaryote ou viral). Par ailleurs, il peut être de nature ubiquitaire ou régulable, notamment en réponse à certains signaux cellulaires tissu-spécifiques ou événements-spécifiques. A titre indicatif, il peut être avantageux de  
5 mettre en oeuvre un promoteur tissu-spécifique lorsque l'on veut cibler l'expression du ou des gène(s) d'intérêt dans une cellule ou un type cellulaire particulier, par exemple les lymphocytes dans le cadre du SIDA, les cellules pulmonaires dans le cadre de la mucoviscidose ou les cellules musculaires dans le cadre des myopathies.

10 A titres d'exemples non limitatifs, on peut citer notamment les promoteurs SV40 (Virus Simian 40), HMG (Hydroxyméthyl-Glutaryl Coenzyme A), TK (Thymidine kinase), les LTRs rétroviraux et, en particulier, celui du MoMuLV ou du MSV lorsqu'on met en oeuvre un vecteur rétroviral, le promoteur tardif MPL (Major Late Promoteur) d'adénovirus de type 2 notamment dans le contexte d'un vecteur  
15 adénoviral, les promoteurs 7,5K et H5R notamment destinés à des vecteurs dérivés de poxvirus et surtout du virus de la vaccine, le promoteur PGK (Phosphoglycéro kinase), les promoteurs foie-spécifiques des gènes codant pour l' $\alpha$ 1-antitrypsine, le facteur IX, l'albumine et la transferrine, les promoteurs des gènes d'immunoglobulines qui permettent une expression dans les lymphocytes, et enfin  
20 les promoteurs des gènes codant pour le surfactant ou la protéine CFTR qui présentent une certaine spécificité pour les tissus pulmonaires.

Par ailleurs, une cassette d'expression présente dans un vecteur selon l'invention peut comporter d'autres séquences nécessaires à l'expression du ou des gène(s)  
25 d'intérêt, tant au niveau de la transcription que de la traduction ; par exemple des séquences activatrices de la transcription de type enhancer, des introns, des signaux de terminaison de la transcription et, comme indiqué précédemment, un signal de sécrétion.

30 L'invention couvre également les virus et particules virales obtenus par transfection du vecteur viral selon l'invention dans une lignée de complémentation adéquate. Selon le type de vecteur viral utilisé, l'homme du métier connaît les lignées de complémentation pouvant être employées pour générer des particules virales infectieuses ainsi que le procédé à mettre en oeuvre. S'agissant d'un vecteur  
35 adénoviral, on peut avoir recours à la lignée 293 (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36, 59-72).

Dans le cadre d'un vecteur rétroviral selon l'invention, on peut envisager d'employer des lignées cellulaires écotropiques, comme la lignée CRE (Danos et Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6460-6464) ou GP + E-86 (Markowitz et al., 1988, J. Virol., 62, 1120-1124). Mais on préfère tout particulièrement mettre en oeuvre une lignée de complémentation amphotropique telle que la lignée PG13 (Miller et al., 1991, J. Virol., 65, 2220-2224) ou Psi Env-am (Markowitz et al., 1988, T.A.A.P. Vol. CI, 212-218). Généralement, on récupère les particules virales infectieuses dans le surnageant de culture des cellules de complémentation transfectées par un vecteur rétroviral selon l'invention.

L'invention s'étend également aux cellules eucaryotes comprenant un fragment d'ADN selon l'invention. Elles peuvent être obtenues par infection par des particules virales infectieuses selon l'invention ou par introduction d'un vecteur plasmidique ou viral soit *in vitro* (dans une cellule prélevée d'un patient ou d'un animal) soit directement *in vivo*. Les méthodes pour introduire un vecteur dans une cellule sont conventionnelles. On peut mettre en oeuvre la technique de précipitation au phosphate de calcium, celle au DEAE dextrane, l'injection directe du vecteur ou d'une portion de celui-ci dans une cellule ou encore l'encapsulation dans des molécules de type liposomes. D'autre part, les vecteurs selon l'invention peuvent être présents dans la cellule hôte soit sous forme intégrée dans le génome cellulaire ou sous forme épisomale aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme de la cellule. La cellule selon l'invention est avantageusement une cellule mammifère et, de préférence, une cellule humaine.

La présente invention concerne également l'usage thérapeutique d'un vecteur ou d'une cellule selon l'invention, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention d'une maladie génétique ou d'une maladie acquise comme le cancer ou une maladie infectieuse. Cependant, un tel usage n'est pas limité à une application de type thérapie génique somatique. En particulier, un vecteur selon l'invention peut être utilisé à d'autres fins comme la production par voie recombinante dans des cellules eucaryotes de produits d'expression destinés à être inclus après purification dans ladite composition pharmaceutique.

L'invention s'adresse également à une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur ou une cellule selon l'invention, en association avec un véhicule acceptable d'un point de vue

pharmaceutique.

5 Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace d'un tel agent à un support, un diluant ou un adjuvant acceptable. Elle peut être administrée selon n'importe quelle route d'administration et ceci en dose unique ou répétée après un certain délai d'intervalle. La quantité à administrer sera choisie en fonction de différents critères, en particulier l'usage à titre de traitement ou de vaccin, la voie d'administration, le patient, le type de maladie à traiter et son état d'évolution, la durée du traitement...etc. A titre indicatif, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu (unité formant des plages), avantageusement entre  $10^5$  et  $10^{13}$  pfu et, de préférence, entre  $10^6$  et  $10^{11}$  pfu de particules virales.

15 Par ailleurs, l'invention concerne une méthode de traitement de maladies génétiques, cancers et maladies infectieuses selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur ou d'une cellule selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement. Selon un premier protocole thérapeutique, on peut les administrer directement *in vivo*, par exemple par injection intraveineuse, intramusculaire ou par aérosolisation dans les poumons. De manière alternative, on peut adopter un protocole de thérapie génique *ex vivo* qui consiste à prélever les cellules d'un patient, cellules souches de la moelle osseuse ou lymphocytes du sang périphérique, à les transfecter avec un vecteur selon l'invention et à les cultiver *in vitro* avant de les réimplanter au patient.

25

L'invention est illustrée ci-après par référence aux figures suivantes.

30 La Figure 1 représente quelques vecteurs rétroviraux utilisables dans le cadre de l'invention a : de type monocistronique, b : de type dicistronique et c : de type mixte comprenant des cassettes d'expression mono et dicistroniques. Les LTRs 5' et 3' sont représentés par une boîte hachurée, les séquences de VL30 murin (rat ou souris) par un trait gras, la séquence Psi rétrovirale par un trait fin, le promoteur interne par une boîte pointillée et enfin les gènes d'intérêt par une boîte blanche.

35

La Figure 2 schématise les vecteurs pVL-CT2, pCBT1, pCBT2, pMLV-LacZ+, pSJE1 et pSJE2.

## EXEMPLES

Les constructions ci-après décrites sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire détaillées dans Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Le remplissage des extrémités 5' protubérantes peut être réalisé à l'aide du fragment Klenow de l'ADN polymérase d'E. coli et la destruction des extrémités 3' protubérantes en présence de l'ADN polymérase du phage T4. Les techniques de PCR sont connues de l'homme de l'art et abondamment décrites dans PCR Protocols, a guide to methods and applications (Ed : Innis, Gelfand, Sninsky et White, Academic Press, Inc.).

Par ailleurs, la position des séquences du VL30 de rat et de souris est indiquée par référence à la molécule ARN, la position +1 correspondant au premier nucléotide de la molécule d'ARN, c'est à dire au site d'initiation de la transcription dans la molécule ADN (premier nucléotide de la séquence R). En ce qui concerne les séquences VL30 de souris, les positions ARN 362-575 et 362-1149 correspondent respectivement aux positions ADN 631-844 et 631-1418 de la séquence décrite dans Adams et al. (1988, Mol. Cell. Biol., 8, 2989-2998)

EXEMPLE 1 : Vecteurs rétroviraux comprenant une séquence d'un VL30 de rat.

1. *Construction des vecteurs dicistroniques*

On isole par PCR un fragment d'ADN de 0,59 kb comportant les séquences du VL30 de rat (positions 205 à 794) et muni à ses extrémités 5' et 3' d'un site NheI. On met en oeuvre le plasmide pVL-CG20 (Torrent et al., 1994, J. Virol., 68, 661-667) à titre de matrice et les oligonucléotides 12 et 13 reportés dans les SEQ ID NO: 3 et 4. Le fragment PCR est digéré par NheI avant d'être inséré dans le vecteur pCB71 digéré par SpeI, pour donner pCBT2. A titre indicatif, on a inclus dans l'oligonucléotide 13 un codon ATG initiateur de la traduction placé dans un contexte favorable de Kozak (A/GCCATGG) qui permettra ensuite d'introduire une séquence codante dépourvue de codon initiateur.

Le plasmide pCB71 est obtenu de la façon suivante :

5 Un fragment EcoRI-XbaI est isolé du plasmide Cla12-AP et cloné entre les mêmes sites du Bluescript II KS+ (Stratagène) pour générer pCB70. Ce fragment comprend le gène de la phosphatase alcaline humaine (PA) décrit dans l'art antérieur (Fekete et Cepko, 1993, Mol. Cell. Biol., 13, 2604-2613). L'introduction de sites de restriction adéquates est à la portée de l'homme du métier.

10 En parallèle, le gène de la néomycine (néo ; positions 4 à 844) est amplifié par PCR à partir du vecteur pLNPOZ (Adam et al., 1991, J. Virol., 65, 4985-4990) et à l'aide des amorces 10 et 11 (SEQ ID NO: 5 et 6) munies à leurs extrémités de sites de restriction Sall, SpeI et BamHI. Le fragment PCR généré est digéré par Sall et BamHI et introduit avec le fragment EcoRV-Sall de pCB70 portant le gène de la phosphatase alcaline dans le vecteur pLNPOZ digéré par BalI et BamHI.

15 La construction finale pCBT2 (Figure 2) contient le LTR 5' du MoMuLV, le gène de la phosphatase alcaline humaine, un fragment de 0,59 kb isolé du VL30 de rat (positions 205 à 794) suivi du gène néomycine et du LTR 3' du MoMuLV.

20 La construction du plasmide pCBT1 s'effectue de la façon comme suit :  
Le fragment EcoRI-NheI de pLNPOZ est cloné dans le Bluescript II KS+ digéré par EcoRI et SpeI pour donner pCB25. Le fragment HindIII-XbaI de pCB25 contenant les séquences codant pour la néomycine, le site IRES du poliovirus et le gène  $\beta$ -galactosidase (LacZ) est cloné dans le vecteur pRc/CMV (Invitrogen) délété des positions 1284 à 3253 et digéré par HindIII et XbaI. Les séquences neo-IRES du poliovirus-LacZ sont ainsi placées sous le contrôle du promoteur de la T7 ARN polymérase pour l'expression *in vitro* et du promoteur précoce du cytomegalovirus pour l'expression dans les cellules eucaryotes.

30 Un fragment portant les séquences virales du virus F-MLV des positions 1 à 651 est généré par PCR à l'aide des amorces 6 et 7 (SEQ ID NO: 7 et 8). On peut utiliser à titre de matrice une préparation d'ADN obtenu de ce virus par les techniques classiques. Le fragment PCR est digéré par XhoI et BamHI puis inséré entre les gènes néo et LacZ de pCB27 partiellement digéré par XhoI et BamHI.

35 Un fragment d'ADN comportant les séquences VL30 de rat (positions 205 à 379) est généré par PCR à partir du vecteur pVL-CG20 et des oligonucléotides 8 et 9 (SEQ ID NO: 9 et 10). Après digestion par NheI, celui-ci est inséré dans le vecteur

pCB28 également clivé par NheI, pour donner pCB57. Ce fragment NheI est isolé de pCB57 et introduit dans le vecteur pCB71 digéré par SpeI. Comme précédemment, ce fragment comporte un codon initiateur de la traduction placé dans un contexte Kozak. On génère pCBT1 (Figure 2) identique à pCBT2 à l'exception de la longueur du fragment VL30 de rat (0,175 kb au lieu de 0,59 kb).

### 2. Construction du vecteur monocistronique pVL-CT2

On isole par PCR un fragment d'ADN comportant les séquences d'HaMSV (position + 1 à + 794) muni à son extrémité 3' d'un site NcoI. On met en oeuvre le plasmide pVL-CG20 (Torrent *et al.*, 1994, *supra*) à titre de matrice et les oligonucléotides 16 et 13 reportés dans les SEQ ID NO: 11 et 4. Le fragment PCR est digéré par SmaI et NcoI avant d'être inséré dans le vecteur pLNPOZ (Adam *et al.*, 1991, *supra*) digéré par NcoI et partiellement par SmaI, pour donner pVL-CT2 (Figure 2).

### 3. Génération de particules virales infectieuses et détermination du taux d'encapsidation et du taux d'expression des gènes néo, phosphatase alcaline et LacZ

La lignée de complémentation écotope GP+E-86 (Markowitz *et al.*, 1988, J. Virol., 62, 1120-1124) et les cellules cibles NIH3T3 (cellules fibroblastiques de souris) disponibles à l'ATCC, sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complémenté avec 5% de sérum de veau de nouveau-né. La veille de la transfection et de l'infection, les cellules GP+E-86 et les cellules cibles NIH3T3 sont mises en culture à raison de 5x10<sup>5</sup> cellules par boîte de 10cm et 1,5x10<sup>5</sup> cellules par puit, respectivement. Les infections virales sont réalisées selon le protocole conventionnel décrit dans la littérature. La méthode de titration est celle dite du point de dilution limite.

Les vecteurs pCBT1, pCBT2 et pVL-CT2 ainsi que le vecteur de référence pMLV-LacZ (Torrent *et al.*, 1994, *supra*) sont transfectés en parallèle dans les cellules GP+E-86 selon la méthode de Chen et Okyama (1987, Mol. Cell. Biol., 7, 2745-2753). Le jour suivant (J+1), les cellules sont lavées selon les méthodes de l'art et on récolte le surnageant de culture à J+2. Différentes dilutions sont utilisées pour infecter les cellules cibles NIH3T3. Les cellules sont cultivées en milieu sélectif (800 µg/ml de G418) 24 heures après la transfection ou l'infection.

On mesure sur une aliquote de culture de cellules infectées et transfectées par pMLV-LacZ et pVL-CT2, l'expression du gène LacZ après coloration X-Gal. Cette technique de coloration est décrite dans les ouvrages de base accessibles à l'homme du métier.

5

De même, on détermine régulièrement au cours du temps, la production de la phosphatase alcaline dans les cellules GP+E-86 transfectées et dans les cellules NIH3T3 infectées par pCBT1 et pCBT2. Pour ce faire, les cellules sont rincées dans du tampon PBS 1 et fixées 5 min à température ambiante avec une solution contenant 2% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde dans du PBS 1. Les cellules ont ensuite rincées deux fois dans du tampon PBS 1 puis incubées 30 min à 65°C dans du PBS 1. Elles sont lavées dans du tampon AP (0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>). Ce tampon est ensuite remplacé par la solution de coloration (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 1, Nitoblue sel de térazolium 1, Levamisol 1 mM dans du tampon AP). les cellules sont incubées 6 heures à température ambiante à l'abri de la lumière. Les cellules colorées correspondent aux cellules phosphatase positives.

10

15

20

Le taux d'encapsulation de chacun des vecteurs est estimé en calculant le rapport nombre de cellules infectées colorées (PA ou LacZ positives) sur le nombre de cellules transfectées colorées (PA ou LacZ positives) x 100. Les résultats sont indiqués dans le Tableau 1 suivant.

25

30

PLASMIDES	TAUX D'ENCAPSIDATION
pMLV-Lac Z <sup>+</sup>	100
pVL-CT2	170
pCBT1	1,8
pCBT2	100

35

Les données indiquent que le fragment d'ADN de VL30 de rat (positions 205 à 794)



comprend un signal d'encapsidation au moins aussi efficace que la séquence Psi du MoMuLV. De manière surprenante, la localisation de la séquence VL30 de rat entre deux gènes affecte peu l'efficacité d'encapsidation du génome rétroviral (vecteur pCBT2 comparé à pVL-CT2).

5

D'autre part, lorsque l'on suit l'expression des gènes PA et néo au cours du temps, la grande majorité des cellules exprimant le gène néo (résistance au G418) expriment simultanément le gène phosphatase. L'expression des deux gènes est stable au cours du temps, puisque plus de 90% des cellules résistantes au G418 sont également phosphatase positives après 40 jours de culture en milieu sélectif.

10

### 3. *Analyse des ARN*

Des cellules à confluence sont lavées (PBS 1X) puis incubées 1 heure à 37°C dans un tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH8,8 ; 0,3M NaCl ; 0,5% SDS ; 0,1%  $\beta$ -mercapto-éthanol ; 100 $\mu$ g/ml protéinase K). Le lysat est extrait deux fois au phénol. Les acides nucléiques sont ensuite précipités en présence de 2,5 volumes d'éthanol froid. Le précipité d'ADN est récupéré à l'aide d'une baguette en verre alors que les ARNs sont précipités 1 heure à -20°C puis centrifugés 30 minutes à 10000 rpm à 4°C. L'ARN cellulaire purifié est repris dans 150  $\mu$ l d'eau stérile.

15

20

Les ARNs cellulaires totaux sont incubés à 65°C pendant 5 min dans un tampon MOPS (20mM acide morpholinopropanesulfonique, 5mM acétate de sodium, 1mM EDTA, pH7) contenant 6% formaldéhyde, 50% formamide, 30% bleu glycérol. Les ARNs dénaturés sont déposés sur gel agarose 0,7% en condition dénaturante (MOPS 1X, 6% formaldéhyde). Les ARNs sont ensuite transférés sur membrane de nitrocellulose dans un tampon phosphate de sodium 25mM pendant 1 heure 30 min à 800mA. La membrane est exposée sous les UV (252 nm ; 0,32 J/cm<sup>2</sup>) pour fixer les ARNs. Puis, la membrane est incubée 4 heures à 42°C dans une solution de préhybridation (50% formamide, 1M NaCl, 50mM NaPO<sub>4</sub> pH7, 10% Dextran sulfate, 1% SDS, 250 $\mu$ g/ml ADN de sperme de saumon dénaturé 5 min à 100°C). La membrane est ensuite hybridée pendant 14 heures à 42°C en 50% formamide, 0,8M NaCl, 50mM NaPO<sub>4</sub> pH7, 10% Dextran sulfate et 1% SDS. La sonde néomycine utilisée à 0,5.10<sup>9</sup> cpm/ $\mu$ g est dénaturée 5 min à 100°C et ajoutée à la solution d'hybridation. Après hybridation, la membrane est lavée dans des bains successifs : 2 x SSC, 1% SDS (2 fois 10 min, température ambiante), 2 x SSC, 0,1% SDS (30 min, 65°C) et 1 x SSC, 0,1% SDS (30 min, 65°C). La membrane

25

30

35

est ensuite séchée et exposée à -80°C pendant 72 heures.

5 La sonde néomycine est complémentaire du gène de la néomycine entre les positions 213 et 596 et correspond au fragment PstI-NcoI de pLNPOZ (Adam *et al.*, 1991). La sonde a été marquée par extension d'amorce avec le kit Nonaprimer kit I (Appligene).

10 Les ARNs cellulaires ont été extraits de cellules GP+E-86 72 heures après transfection du plasmide pCBT2, ou bien de cellules NIH3T3 infectées avec des virions pCBT2 après 30 jours de sélection. L'hybridation de ces ARNs avec une sonde complémentaire du gène néo révèle la présence d'un seul ARN dicistronique de taille identique dans les cellules transfectées et infectées. En conséquence, l'expression simultanée des gènes phosphatase et néomycine dans 90-95% des  
15 cellules infectées après 30 jours de sélection est due à la présence d'un seul ARN dicistronique.

EXEMPLE 2 : Vecteur rétroviral comprenant une séquence d'encapsulation isolée d'un VL30 de souris.

20

1. *Construction des vecteurs*

Un fragment d'ADN contenant la séquence VL30 de souris (positions 362 à 1149) est amplifié par PCR à partir du vecteur pKT403 (Adams *et al.*, 1988, *supra*) et à l'aide des amorces oligonucléotidiques 3 et 4 (SEQ ID NO: 12 et 13). Le fragment  
25 généré est digéré par BalI et NcoI avant d'être inséré entre les mêmes sites du vecteur pLNPOZ (Adam *et al.*, 1991, *supra*). On obtient le vecteur pSJE2.

30 Par ailleurs, un fragment d'ADN comprenant une séquence plus courte de VL30 de souris (positions 362-575) également obtenu par PCR à partir de la matrice pKT403 et des oligonucléotides 1 et 2 (SEQ ID NO: 14 et 15), est introduit dans le vecteur pLNPOZ comme décrit ci-dessus. On obtient pSJE1.

35 Les vecteurs pSJE1 et pSJE2 comprennent le LTR 5' du MoMuLV, le fragment VL30 de souris indiqué, le gène LacZ et le LTR 3' du MoMuLV. A titre de témoin négatif, on construit le vecteur pSJE3 identique aux deux précédents mais dans lequel la séquences VL30 est remplacée par un polylinker. Il est obtenu par

introduction de l'oligonucléotide 5 (SEQ ID NO: 16) entre les sites *BalI* et *NcoI* de pLNPOZ.

## 2. Détermination du taux d'encapsidation

5

La technologie utilisée est comparable à celle décrite dans l'exemple 1. Brièvement, les vecteurs pSJE1, 2 et 3 sont transfectés dans des lignées murines de complémentation, GP + E-86 ou CRIP (Danos et Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6460-6464). Le surnageant de culture est utilisé pour infecter les  
10 cellules cibles murines NIH3T3. On mesure l'expression du gène LacZ dans les cellules infectées et transfectées après coloration X-Gal. Le titre viral correspond au rapport nombre de cellules bleues (LacZ+) infectées sur le taux de transfection multiplié par le volume de surnageant viral utilisé. Le tableau 2 suivant donne une  
15 estimation des titres viraux obtenus pour chacun des vecteurs pSJE en fonction de la lignée de complémentation de départ. On utilise à titre de référence le vecteur pMLVLacZ+ (Torrent et al., 1994, *supra*) comprenant la région d'encapsidation conventionnelle du MoMuLV.

20

PLASMIDES	TITRES SUR GP + E86 (/ml) EN EXPRESSION TRANSITOIRE	TITRES SUR CRIP (/ml) EN EXPRESSION TRANSITOIRE
pSJE1	$0,1 \times 10^5$	$0,7 \times 10^4$
pSJE2	$1 \times 10^5$	$6,5 \times 10^4$
pSJE3	$< 0,001 \times 10^5$	$< 0,01 \times 10^4$
pMLVLacZ*	$0,85 \times 10^5$	$7 \times 10^4$

25

Les résultats montrent que la séquence VL30 de souris comprise entre les nucléotides 362 et 1149 comprend une séquence d'encapsidation au moins aussi efficace que celle du MoMuLV. Une séquence VL30 plus courte (positions 362-575) est encore capable d'encapsidation quoiqu'à un taux plus faible. Comme attendu, le vecteur pSJE3, dépourvu de toute région d'encapsidation est incapable de générer  
30 des particules virales.

Par ailleurs, lorsque l'on remplace dans le vecteur pCBT2 la séquence VL30 de rat

2722208

- 19 -

par une des séquences VL30 de souris (soit le fragment 0,78 kb allant des positions 362 à 1149 soit le fragment 0,21 kb allant des positions 362 à 575), on mesure un taux d'encapsidation efficace et une expression correcte du gène de la phosphatase alcaline.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

## (i) DEPOSANT:

(A) NOM: INSERM  
 (B) RUE: 101 rue de Tolbiac  
 (C) VILLE: Paris cedex 13  
 (E) PAYS: France  
 (F) CODE POSTAL: 75654  
 (G) TELEPHONE: (1) 44 23 60 00  
 (H) TELECOPIE: (1) 45 85 68 56

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveau site interne d'entree des ribosomes,  
 vecteur le contenant et utilisation therapeutique.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 16

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
 (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 590 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Rattus  
 (B) SOUCHE: element VL30 de rat

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GGCAAGCCGG CCGGCGTTTG TCTTGTCTGT TGTGTCTTGT CCTGTGAACG ATCGATCAAT	60
AGGCTCAGAT CTGGGGACTA TCTGGGCGGG CCAGAGAAGG AGCTGACGAG CTCGGACTTC	120
TCCCCCGCAG CCCTGGAAGA CGTTCCAAGG GTGGTTGGAG GAGAGGGAGA TGCGGATCCG	180
TGGCACCTCC GTCCGTTTTT GGAGGGATCC GCACCCTTGA TGAATTTTTC	240
GTTTCACTTT GGTACCGAAG CTGCGCGGCG CGCTGCTTGT TACTTGTTC ACTGTTGGAA	300
TTGTTTGTCT TCTTTGTGAC CTGACTGTGG TTTCTGGAC GTGTTGTGTC TGTTAGTGTC	360
TTTTTGACTT TTGTTTCGTG TTTGAATTG GACTGACGAC TGTGTTTAAA ATCTTAGACC	420
GACGACTGTG TTTGAAATCA TGAAACTGTT TGCTTTGTTT GTCGAAGAGT TTTACTTGGT	480
CCCCTTAACG CTTAGTGAGT AAGAACTTA ATTTTGTAGA CCCCCTCTA GTGGCAGTGT	540

GTGTTGTTGAT AGCCAAAGTT AATTTTAAAC ACATAGTGT TTGGGGGTTG

590

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 788 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: element VL30 de souris

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

GATTCTTTGT TCTGTTTTGG TCTGATGTCT GTGTTCTGAT GTCTGTGTTC TGTTCCTAAG	60
TCTGGTGCGA TCGCAGTTTC AGTTTTGCGG ACGCTCAGTG AGACCGCGCT CCGAGAGGGA	120
GTGCGGGGTG GATAAGGATA GACGTGTCCA GGTGTCCACC GTCCGTTCGC CCTGGGAGAC	180
GTCCCAGGAG GAACAGGGGA GGATCAGGA CGCTGGTGG ACCCCTTTGA AGGCCAAGAG	240
ACCATTTGGG GTTGCGAGAT CGTGGGTTTC AGTCCCACCT CGTCCCCAGT TGCGAGATCG	300
TGGGTTTCGAG TCCCACCTCG TGTTTGTTG CGAGATCGTG GGTTCGAGTC CCACCTCGCG	360
TCTGGTCACG GGATCGTGGG TTCGAGTCCC ACCTCGTGT TTGTTGCGAG ATCGTGGGTT	420
CGAGTCCCAC CTCGCGTCTG GTCACGGGAT CGTGGGTTTC AGTCCCACCT CGTGCAGAGG	480
GTCTCAATTG GCCGGCCTTA GAGAGGCCAT CTGATTCTTC TGGTTTCTCT TTTGTCTTA	540
GTCTCGTGTC CGCTCTTGTT GTGACTACTG TTTTCTAAA AATGGGACAA TCTGTGTCCA	600
CTCCCCTTTC TCTGACTCTG GTTCTGTGCG TTGTAATTT TGTTTGTTTA CGTTTGTTT	660
TGTGAGTCGT CTATGTTGTC TGTTACTATC TTGTTTTGT TTGTGGTTTA CGGTTTCTGT	720
GTGTGTCTTG TGTGTCTCTT TGTGTTTCTA CTTGGACTGA TGAAGTACGA CTGTTTTTAA	780
GTTATGCC	788

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: element VL30 d rat

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 12

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GGGCTAGCGG CAAGCCGGCC G

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: element VL30 de rat

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 13

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GGGCTAGCCC CATGGCAACC CCCAAAACAC

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: gene neomycine

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 10

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GGGGTCGACA CTAGTGATTG AACAA

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: gene neomycine

(C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 1:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GCTCTAGAGG ATCCGGCAGG TTGGGCG

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Murine leukemia virus
- (B) SOUCHE: souche Friend (oligo 6)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GCTCGAGCTA GCTGCAGCGC CAGTCCTCCG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Murine leukemia virus
- (B) SOUCHE: souche Friend
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 7

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CGGGATCCGC TAGCAAACCTT AAGGGG

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
  - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
  - (B) TYPE: acide nucléique
  - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
  - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON



- 24 -

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: element VL30 de rat
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 8

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GGGCTAGCGG CAAGCCGGCC G

21

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (iii) ANTI-SENS: OUI

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: element VL30 de rat
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 9

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GGGCTAGCCC CATGGCCGGA TCTCCCTC

28

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (iii) HYPOTHETIQUE: NON

## (iii) ANTI-SENS: NON

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Murine sarcoma virus
- (B) SOUCHE: HaMSV
- (C) INDIVIDUEL ISOLE: oligo 16

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

GCTCGAGCTA GCTGCAGCGC CAGTCCTCCG T

31

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- 25 -

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: element VL30 de souris (oligo 3)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

CCGAATTCTG GCCAGATTCT TTGTTCTG

28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 29 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: element VL30 de souris (oligo 4)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

CCGCTAGCCC CATGGCAACT TAAAAACAG

29

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 28 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(B) SOUCHE: element VL30 de souris

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

CCGAATTCTG GCCAGATTCT TTGTTCTG

28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 27 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

- 26 -

- (vi) ORIGINE:  
(B) SOUCHE: element VL30 de souris (oligo 2)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

CCGCTAGCCC CATGGCGTCC CTGATCC

27

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:  
(B) SOUCHE: polylinker (oligo 5)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

TGGCCAGCTG AAGCTTGCCA TGGG

24

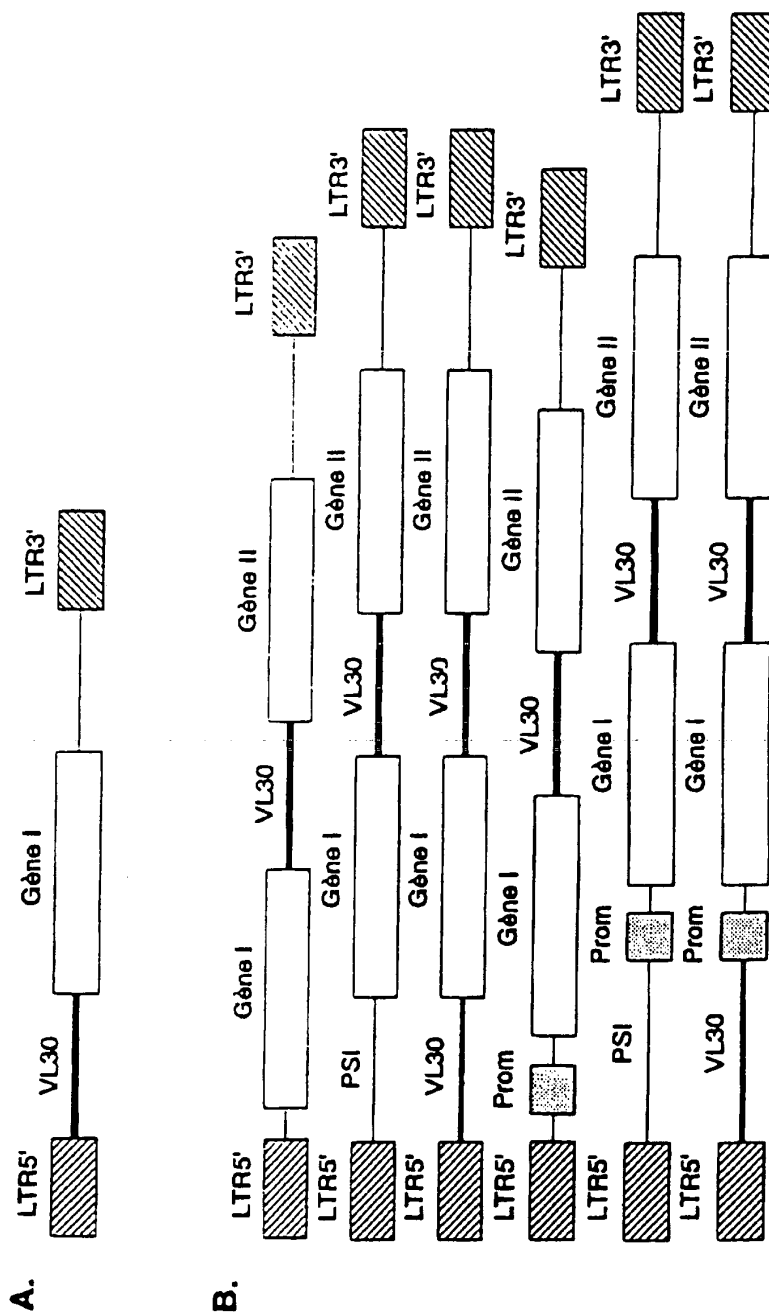
### Revendications

1. Un fragment d'ADN isolé comprenant un site interne d'entrée des ribosomes et/ou une séquence d'encapsulation, caractérisé en ce que ledit fragment est dérivé d'un rétrotransposon.
2. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 100 nucléotides correspondant à l'extrémité 5' dudit rétrotransposon en aval de la répétition directe.
3. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est dérivé d'un élément cellulaire mobile de type VL30 d'origine murine.
4. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est dérivé d'un élément cellulaire mobile de type VL30 de rat.
5. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est substantiellement homologue à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 1, commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 590.
6. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est dérivé d'un élément cellulaire mobile de type VL30 de souris.
7. Un fragment d'ADN isolé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est substantiellement homologue à la séquence présentée dans l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2, commençant au nucléotide 1 et se terminant au nucléotide 788.
8. Un vecteur pour l'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt comprenant un fragment d'ADN selon l'une des revendications 1 à 7.
9. Un vecteur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique ou d'un vecteur viral dérivé d'un virus sélectionné parmi le groupe des poxvirus, adénovirus, baculovirus, virus de l'herpès, virus associé à un adénovirus et rétrovirus.
10. Un vecteur selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN est positionné en amont d'un gène d'intérêt pour améliorer la traduction du produit d'expression pour lequel ledit gène code.
11. Un vecteur rétroviral selon la revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit fragment d'ADN est positionné :
  - (i) en aval du LTR 5' dudit vecteur rétroviral ; et/ou
  - (ii) en amont d'un gène d'intérêt

pour permettre l'encapsidation dudit vecteur rétroviral et/ou pour améliorer la traduction du produit d'expression pour lequel ledit gène code.

12. Un vecteur rétroviral selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence d'encapsidation issue d'un rétrovirus.
13. Un vecteur rétroviral selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que le LTR 5' dudit vecteur rétroviral contrôle l'expression d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt.
14. Un vecteur selon l'une des revendications 8 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux fragments d'ADN selon l'une des revendications 1 à 7 ; lesdits fragments d'ADN étant dérivés de rétrotransposons d'origines différentes.
15. Un vecteur selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment d'ADN selon la revendication 4 ou 5 et un fragment d'ADN selon la revendication 6 ou 7.
16. Un vecteur selon l'une des revendications 8 à 15, caractérisé en ce qu'il comprend un gène d'intérêt codant pour un produit d'expression sélectionné parmi le facteur VIII, le facteur IX, la protéine CFTR, la dystrophine, l'insuline, l'interféron gamma, une interleukine et un marqueur de sélection.
17. Une particule virale générée à partir d'un vecteur viral selon l'une des revendications 8 à 16.
18. Une cellule animale comprenant un vecteur selon l'une des revendications 8 à 16 ou infectée par une particule virale selon la revendication 17.
19. Utilisation d'un vecteur selon l'une des revendications 8 à 16, d'une particule virale selon la revendication 17 ou d'une cellule animale selon la revendication 18 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention d'une maladie traitable par thérapie génique.
20. Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique, un vecteur selon l'une des revendications 8 à 16, une particule virale selon la revendication 17 ou une cellule animale selon la revendication 18 en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
21. Une composition pharmaceutique selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle comprend entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu, et de préférence entre  $10^6$  et  $10^{11}$  pfu particules virales selon la revendication 17.

Figure 1



C.

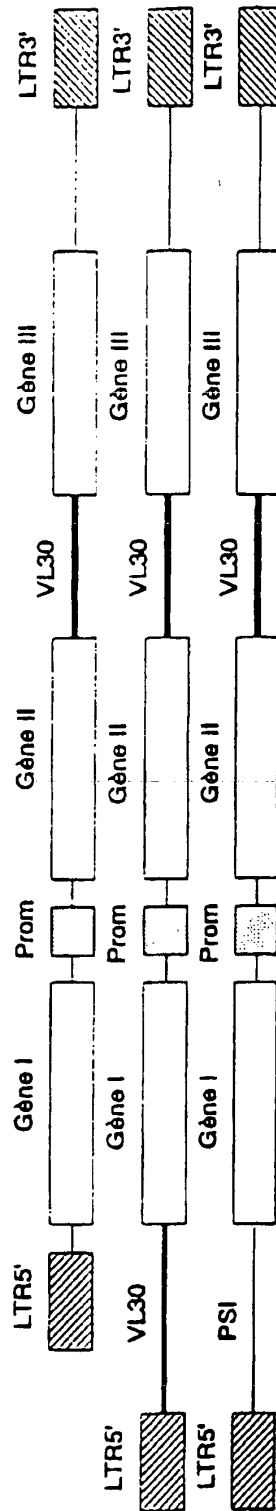
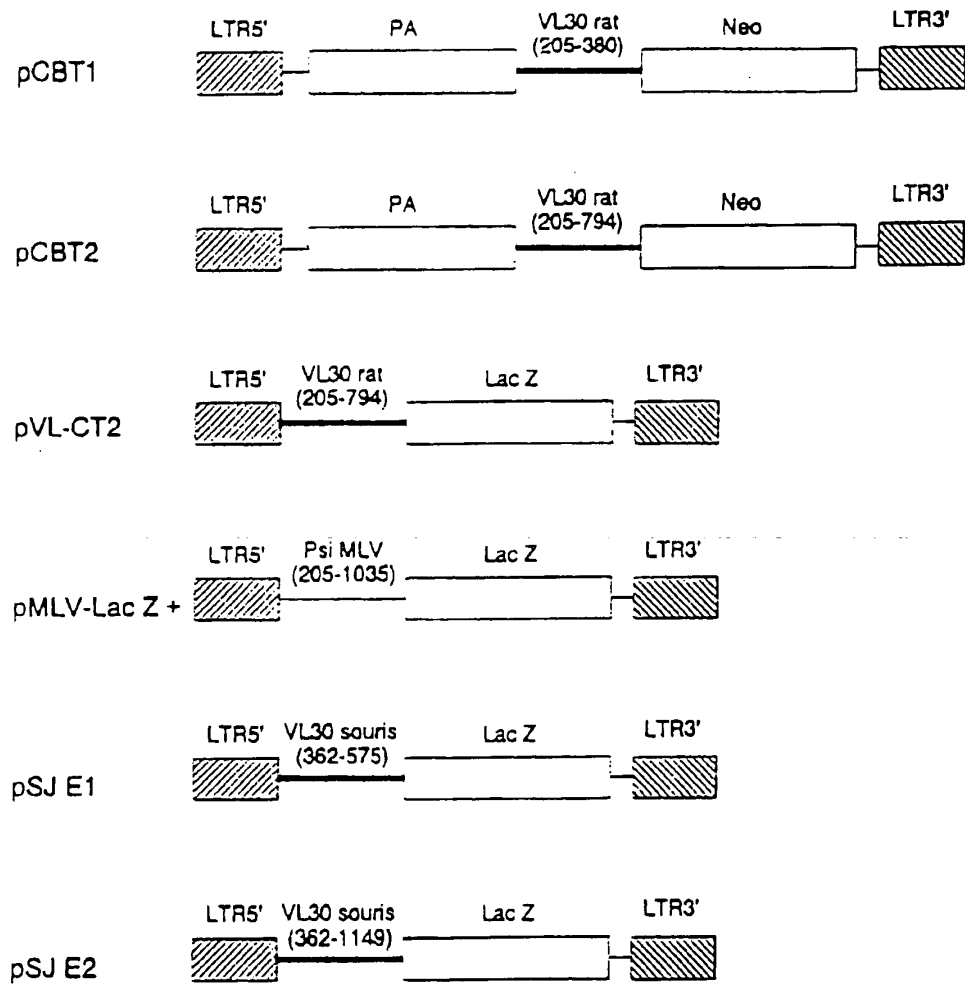


Figure 2





REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2722208

N° d'enregistrement  
national

FA 502566  
FR 9408300

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,X	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68,no. 2, Février 1994 pages 661-667, TORRENT, C. ET AL. 'A small and efficient dimerization/packaging signal of rat VL30 RNA and its use in murine leukemia virus-VL30-derived vectors for gene transfer'	1-5	
Y	* le document en entier *	8-10, 17-21	
Y,D	WO-A-93 03143 (ANDERSON W FRENCH ;MORGAN RICHARD A (US); COUTURE LARRY (US)) 18 Février 1993 * page 5 - page 9 * * revendications *	8-10, 17-21	
X	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18,no. 3, 1990 OXFORD GB, page 673 HODGSON, C. ET AL. 'Nucleotide sequence of mouse virus-like (VL30) retrotransposon BVL-1' * le document en entier *	1-3,6,7	
A	WO-A-92 07950 (HODGSON CLAGUE PITMAN) 14 Mai 1992 * page 10, ligne 25 - page 15 * * revendications *	1-21	
D,A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 8,no. 8, Août 1988 WASHINGTON US, pages 2989-2998, ADAMS, S. ET AL. 'Complete nucleotide sequence of a mouse VL30 retro-element' * figure 1 *	1-7	
Date d'achèvement de la recherche			Examinateur
4 Avril 1995			Andres, S
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande I : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1  
EPO FORM 150 (04/92) (PACC)